Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 19, No. 4, Oct.-Nov. 2023, p. 415-425

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۹، شماره ۴، مهر- آبان ۱۴۰۲، ص. ۴۲۵-۴۱۵

Research Article
Homepage: https://ifstrj.um.ac.ir

Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Properties of Nanoemulsion of *Citrus paradisi* Essential Oil Against Pathogenic Microorganisms: *In Vitro* Study

H. Zanganeh[1], F. Shahidi[2], S.A. Mortazavi[3]*, B. Alizadeh Behbahani[4]

Received: 2021.07.26
Revised: 2021.09.07
Accepted: 2021.09.12
Available Online: 2021.09.15

How to cite this article:
Zanganeh, H., Shahidi, F., Mortazavi, S.A., & Alizadeh Behbahani, B. (2023). Evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of nanoemulsion of *Citrus paradisi* essential oil against pathogenic microorganisms: *in vitro* study. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, *19*(4), 415-425. (In Persian with English abstract).
https://doi.org/10.22067/ifstrj.2021.71660.1074

Introduction

Oxidation reactions and microorganisms' activity are considered as the most important factors affecting the quality of food products. Recently, in the light of the inefficiency of some chemical preservatives against microorganisms and the presence of toxic residues in food products, the use of natural antimicrobials and antioxidants has been increased. Natural antimicrobial compounds have the potential to control microbial contamination and reduce the use of antibiotics. Plant essential oils are natural compounds with the potential to be used as active ingredients in the food, pharmaceutical, and cosmetic industries. Various studies have shown that essential oils have antifungal, antibacterial, antiviral, and antioxidant activity. The essential oils are considered as superb preservatives with various biological functions. Essential oils are generally recognized as safe product (GRAS) which can be used as an alternative to synthetic additives.

Grapefruit (*Citrus paradisi*) peel and fruit contain active ingredients such as acids, flavonoids, vitamin C, and potassium, and its essential oil is composed of terpenic hydrocarbons, such as citral, limonene, citronelal, and geraniol. Although plant essential oils have antimicrobial and antioxidant properties, one of the main problems of these natural compounds is their high volatility and instability. In this context, nanoemulsion formulations are frequently used to increase the stability and efficiency of these biologically active compounds. This study is therefore aimed to nanoemulsifying the grapefruit essential oil and evaluate its antioxidant and antimicrobial properties.

Materials and Methods

β-carotene, linoleic acid, ABTS (2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt), and DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) were purchased from Sigma-Aldrich Co. (USA). Mueller Hinton Broth (MHB) and Mueller Hinton Agar (MHA) were supplied from Merck Co. (Darmstadt, Germany). Grapefruit peel was dried at ambient temperature and then powdered. The obtained powder was then transferred to a Clevenger device containing 750 ml of distilled water to perform the distillation extraction (3 h). The resulting grapefruit essential oil was stored at 4 °C until use. Grapefruit essential oil was prepared using the hydrodistillation method, and then nanoemulsified. The antioxidant activity of the nanoemulsified essential oil was investigated by DPPH and ABTS radical scavenging activity and beta-carotene/linoleic bleaching test. The nanoemulsified essential oil or methanolic (control) was mixed with DPPH solution and the mixture was then stored at ambient temperature for 30 min, in a dark place. The control sample was

1, 2 and 3- Ph.D. Student and Full Professors, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad (FUM), Mashhad, Iran, respectively.
(*- Corresponding Author Email: morteza@um.ac.ir)
4- Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran
DOI: 10.22067/ifstrj.2021.71660.1074

prepared by methanol. The absorbance of the samples was measured at 517 nm. To determine the ABTS-RS activity, the nanoemulsified essential oil was briefly charged with methanolic ABTS radical cation solution and the resulting mixture was left at room temperature for 30 min. Afterward, the absorbance was read at 734 nm. A spectrophotometric method was applied to monitor β-carotene/linoleate solution bleaching in the presence of the nanoemulsified essential oil. To do this, the absorbance of the solution was recorded at 490 nm after 120 min against the control sample at time zero and after 120 min. Antibacterial effect of the grapefruit essential oil nanoemulsion was also evaluated against *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhi* ATCC 6539, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Listeria innocua* ATCC 33090, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Bacillus subtilis* ATCC 23857, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *and Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, based on disk diffusion agar, well diffusion agar, minimum inhibitory concentration, and minimum bactericidal concentration.

Results and Discussions

The results showed that the nanoemulsion of grapefruit essential oil had a remarkable antioxidant effect of 42.27 mg/ml, 33.27 mg/ml and 54.54%, respectively, based on DPPH, ABTS, and beta-carotene-linoleic acid bleaching tests. According to disk diffusion agar and well diffusion agar results, the lowest inhibition zone was related to *E. coli* and the highest inhibition zone was observed in *L. innocua*. The minimum inhibitory concentration for *L. innocua* and *S. aureus* (the most sensitive bacteria) was 25 mg/ml, and *E. coli*, *S. typhi*, and *P. aeruginosa* had the highest inhibitory concentration. Also, the lowest bactericidal concentration was related to *L. innocua* and *S. aureus* bacteria and the highest concentration was observed for *E. coli*, *S. typhi* and *P. aeruginosa*. The nanoemulsified essential oil generally exhibited greater antibacterial activity against Gram-positive species. This could be mainly due to the difference in the cell wall composition of Gram-positive bacteria in comparison to Gram-negative; Gram-positive bacteria have a thicker mucopeptide layer in their cell wall, while Gram-negative bacteria have only a thin layer of mucopeptide and the wall structure is mainly composed of lipoprotein and lipopolysaccharide, thereby leading to a higher resistant to antibacterial agents According to the results, grapefruit essential oil nanoemulsion can be used as a natural antioxidant and antimicrobial agent to control oxidation reactions and the growth of spoilage and pathogenic microorganisms.

Keywords: Antimicrobial activity, Antioxidant effect, Grapefruit essential oil, Nanoemulsion

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۹، شماره ۴، مهر- آبان ۱۴۰۲ ص. ۴۲۵-۴۱۵

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 19, No. 3, Oct.-Nove. 2023, p. 415-425

مقاله پژوهشی

بررسی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی نانوامولسیون اسانس گریپ‌فروت بر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا: یک مطالعه آزمایشگاهی

حسین زنگانه[1]- فخری شهیدی[2]- سیدعلی مرتضوی[3]*- بهروز علیزاده بهبهانی[4]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۰۴
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۰۶/۱۶
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۲۱

چکیده

در این مطالعه، فعالیت آنتی‌اکسیدانی نانوامولسیون اسانس گریپ‌فروت (برحسب درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS و رنگبری بتاکاروتن-لینولئیک اسید) و اثر ضدمیکروبی آن در برابر باکتری‌های پاتوژن و مولد فساد *Escherichia coli*، *Salmonella typhi*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Listeria innocua*، *Staphylococcus aureus*، *Bacillus cereus*، *Bacillus subtilis*، *Streptococcus pyogenes* و *Staphylococcus epidermidis* بر اساس روش‌های دیسک دیفیوژن آگار، چاهک آگار و حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی بررسی گردید. نتایج نشان داد که نانوامولسیون اسانس گریپ‌فروت دارای اثر آنتی‌اکسیدانی قابل‌توجه ۴۲/۲۷ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، ۳۳/۲۷ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و ۵۴/۵۴ درصد به‌ترتیب برحسب آزمون‌های مهار رادیکال DPPH، ABTS و رنگبری محلول بتاکاروتن-لینولئیک اسید می‌باشد. با توجه به نتایج، کمترین میزان قطر هاله عدم رشد مربوط به باکتری *E. coli* و بیشترین میزان قطر هاله عدم رشد در باکتری *L. innocua* مشاهده گردید. حداقل غلظت مهارکنندگی برای باکتری‌های *L. innocua* و *S. aureus* (حساس‌ترین باکتری‌ها) برابر با ۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود و باکتری‌هایی مانند *E. coli*، *S. typhi* و *P. aeruginosa* بیشترین غلظت مهارکنندگی (۲۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) را به خود اختصاص دادند. همچنین کمترین غلظت کشندگی (۲۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) مربوط به باکتری‌های *L. innocua* و *S. aureus* و بیشترین مقدار آن (بیش از ۴۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) مربوط به *E. coli*، *S. typhi* و *P. aeruginosa* بود. مطابق نتایج، نانوامولسیون اسانس گریپ‌فروت را می‌توان بعنوان ترکیب طبیعی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی جهت کنترل واکنش‌های اکسیداسیون و رشد میکروارگانیسم‌های مولد فساد و پاتوژن استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: اثر آنتی‌اکسیدانی، اسانس گریپ‌فروت، فعالیت ضدمیکروبی، نانوامولسیون

مقدمه

واکنش‌های اکسیداسیون و فعالیت میکروارگانیسم‌ها از جمله عوامل مهم در کاهش کیفیت مواد غذایی می‌باشند. امروزه عدم تأثیر برخی از نگهدارنده‌های شیمیایی بر تعدادی از میکروارگانیسم‌ها و وجود بقایای سموم شیمیایی در محصولات غذایی و همچنین اثرات سرطان‌زای این ترکیبات، استفاده از مواد ضد میکروبی طبیعی را افزایش داده است. ترکیبات ضد میکروبی طبیعی قادر به کنترل آلودگی‌های میکروبی، کاهش میزان استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های سنتزی و افزایش ماندگاری و تقویت ایمنی سلول‌ها می‌باشند (Noshad *et al.*, 2020). اسانس‌های گیاهی ترکیبات طبیعی می‌باشند که در صنایع غذایی، دارویی و آرایشی کاربرد گسترده‌ای دارند. در پژوهش‌های مختلف نشان داده شده است که اسانس‌ها دارای فعالیت ضد قارچی، ضد باکتریایی،

۱، ۲ و ۳- به‌ترتیب دانشجوی دکتری و استادان، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: morteza@um.ac.ir)
۴- دانشیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران
DOI: 10.22067/ifstrj.2021.71660.1074

ضد ویروسی و آنتی‌اکسیدانی بوده که این ویژگی‌ها استفاده از این ترکیبات را به عنوان افزودنی‌های ضد میکروبی به منظور افزایش ماندگاری نوشیدنی‌ها و مواد غذایی افزایش داده است (Ahmadi *et al*., 2020).

گیاه گریپ‌فروت (*Citrus paradisi*) از خانواده مرکبات می‌باشد که در شمال و جنوب ایران یافت می‌شود. این گیاه همچنین در مجمع الجزایر مالاکا، کالیفرنیا، فلوریدا و هند نیز کشت می‌شود. این درخت دارای تنه‌ای منشعب، برگ‌های ساده، سبز و معطر، گل‌های تقریباً بزرگ، سفید، معطر و میوه‌های کروی آبدار به رنگ زرد یا لیمویی با طعمی ترش و مقداری تلخ می‌باشد. پوست و میوه گریپ‌فروت حاوی ترکیبات فعالی مانند اسیدها، فلاونوئیدها، ویتامین C و پتاسیم بوده و اسانس آن از هیدروکربن‌های ترپنی مانند سیترال، لیمونن، سیترونلال و ژرانیول تشکیل شده است (Mesgarpour *et al*., 2002). در مطالعه یانگ و همکاران (Yang *et al*., 2010) اثر آنتی‌اکسیدانی اسانس گریپ‌فروت گزارش شده است. همچنین خاصیت ضد میکروبی اسانس این گیاه در مطالعه آلوز و همکاران (Alves *et al*., 2015) بررسی و تأیید شده است.

با وجود خاصیت ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی اسانس‌های گیاهی از مشکلات عمده این ترکیبات طبیعی فراریت بالا و به دنبال آن ناپایداری آن‌ها می‌باشد. از جمله راه‌های مقابله با این مشکل استفاده از فرمولاسیون نانوامولسیون بوده که استفاده از این فناوری منجر به افزایش چشم‌گیر پایداری و کارایی این ترکیبات می‌شود (Heydari and Bagheri, 2018). نانوامولسیون‌ها ذرات با اندازه ۱۰۰۰–۱۰۰ نانومتر می‌باشند که به دو گروه شفاف (ذراتی به اندازه ۲۰۰–۵۰ نانومتر) و غیر شفاف (ذراتی تا ۵۰۰ نانومتر) تقسیم می‌شوند. بر اساس درصد وزنی فازهای تشکیل‌دهنده در دو گروه روغن در آب[1] و آب در روغن[2] جای می‌گیرند (Poorhasan *et al*., 2012). نانوامولسیون‌ها دارای پایداری سینتیکی بالایی بوده و از روش‌های مختلف مانند روش خود به خودی و تغییر فاز، هموژنایزر و امواج اولتراسوند جهت تولید آن‌ها استفاده می‌شود (Erfani *et al*., 2019). نانوامولسیون‌ها به دلیل حل کردن ترکیبات غیرقطبی و ایجاد پیوندهای کوالانسی ترکیبات غیر قطبی بیشتری داشته و با افزایش نسبت سطح به حجم قطرات توانایی بیشتری در ریزپوشانی ترکیبات مؤثر در تولید عطر و طعم را دارا می باشند. نانوامولسیون‌ها ابزاری مناسب جهت ریزپوشانی و اثرپذیری ترکیبات ضد باکتری می‌باشند و مکانیسم اثر ضد باکتریایی آن‌ها به عوامل مختلف مانند ماهیت ضد باکتری اسانس مورد استفاده در ساختار آن‌ها بستگی دارد (Javanshir *et al*., 2020). معصومی و همکاران (Masoumi *et al*., 2016) گزارش کردند که نانوامولسیون‌های آویشن شیرازی می‌تواند به عنوان یک ماده ضد میکروبی در برابر باکتری *Escherichia coli* O157: H7 مطرح شود (Masoumi *et al*., 2016). در پژوهش قرەنقده و همکاران (Gharenaghadeh *et al*., 2017) بیان شده است که نانوامولسیون‌های اسانس مریم‌گلی در مقایسه با اسانس در حالت آزاد بر روی تمامی باکتری‌های مورد مطالعه از جمله *Bacillus cereus*، *Enterococcus faecalis*، *Klebsiella pneumoniae* و *Moraxella catarrhalis* دارای اثر ضد میکروبی بیشتری می‌باشد (Gharenaghadeh *et al*., 2017). همچنین گزارش شده است که فعالیت ضد میکروبی اسانس آویشن دنایی در برابر باکتری *E. coli* هنگامی که به نانوامولسیون تبدیل می‌شود، به میزان قابل‌توجهی افزایش می‌یابد، که به سهولت دسترسی اسانس به سلول های باکتری نسبت داده می‌شود (Moghimi *et al*., 2016). با توجه به ترکیبات مؤثره موجود در اسانس گریپ‌فروت و ناپایداری این ترکیبات، در این پژوهش نانوامولسیون اسانس این گیاه تهیه و فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی آن مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی DPPH[3]، ABTS[4]، بتاکارتن و لینولئیک اسید از شرکت سیگما (آمریکا) و محیط‌های کشت مولر هینتون آگار، مولر هینتون براث، دیسک بلانک و محلول تری‌فنل‌تترازولیوم از شرکت مرک (آلمان) تهیه شدند.

سویه‌های میکروبی

باکتری‌های مورد مطالعه در این پژوهش شامل *Escherichia coli* ATCC 25922، *Salmonella typhi* ATCC 6539، *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853، *Listeria innocua* ATCC 33090، *Staphylococcus aureus* ATCC 25923، *Bacillus cereus* ATCC 14579، *Bacillus subtilis* ATCC 23857، *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 و *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 بودند که از مجموعه میکروبی گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شدند.

تهیه اسانس گریپ‌فروت

پس از آسیاب ۵۰۰ گرم گریپ‌فروت تازه (مشهد، ایران)، اسانس آن از طریق روش تقطیر با آب در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد با کمک

1- Oil in Water (o/w)
2- Water in Oil (w/o)

3- 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
4- 2,2- azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)

دستگاه کلونجر استخراج گردید. پس از حذف آب اضافی اسانس استخراج شده با استفاده از Na_2SO_4 خشک و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Lou *et al*., 2017).

تهیه نانوامولسیون‌های اسانس گریپ‌فروت

نانوامولسیون‌های اسانس گریپ‌فروت با مخلوط کردن اسانس گریپ‌فروت با توئین ۸۰ و آب با نسبت‌های ۸۹:۱:۱۰ وزنی/ وزنی با استفاده از اولتراسونیک هموژنایزر در مدت ۱۵ دقیقه، دامنه ۷۲ میکرومتر، قدرت ۵۰۰ وات و فرکانس ۲۰ کیلوهرتز تهیه گردید (Özogul *et al*., 2021).

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی نانوامولسیون اسانس

روش مهار رادیکال آزاد DPPH

در ابتدا ۱ میلی‌لیتر نانوامولسیون اسانس یا متانول (بعنوان نمونه کنترل) با ۳ میلی‌لیتر معرف DPPH (با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار) مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی در دمای محیط قرار داده شد. سپس جذب نمونه در طول‌موج ۵۱۷ نانومتر ثبت گردید. از فرمول زیر جهت محاسبه فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH نانوامولسیون اسانس استفاده شد (Tanavar *et al*., 2020):

[جذب نمونه کنترل / (جذب نانوامولسیون اسانس ─ جذب نمونه کنترل)] × ۱۰۰ = فعالیت حذف‌کنندگی رادیکال آزاد

نتایج این آزمون بر حسب IC_{50} (غلظتی از نانوامولسیون اسانس که سبب مهار ۵۰ درصد از رادیکال آزاد DPPH می‌شود) گزارش گردید.

روش مهار رادیکال آزاد ABTS

رادیکال‌های آزاد ABTS از طریق اضافه کردن پتاسیم پرسولفات به محلول آبی ABTS با غلظت ۷ میلی‌مولار و رسیدن غلظت نهایی به ۲/۴۵ میلی‌مولار تهیه شد. سپس محلول به دست آمده به مدت ۱۶ ساعت در دمای اتاق و در محلی تاریک نگهداری شد. در مرحله بعد رقیق‌سازی کاتیون رادیکال $ABTS^+$ تا رسیدن به جذب ۰/۰۲ ± ۰/۷ در طول‌موج ۷۳۴ نانومتر انجام شد. در پایان ۳ میلی‌لیتر از محلول رادیکالی ABTS با ۳۰ میکرولیتر از نانوامولسیون اسانس گریپ‌فروت مخلوط و پس از ۶ دقیقه جذب نمونه اندازه‌گیری شد. همانند روش مهار رادیکال آزاد DPPH در این روش نیز نتیجه بر حسب IC_{50} گزارش گردید (Majdi *et al*., 2021).

روش رنگ‌بری بتاکاروتن- لینولئیک اسید

این روش بر اساس جلوگیری از اکسیداسیون لینولئیک اسید و رنگ‌بری بتاکاروتن با استفاده از رادیکال‌های آزاد که توانایی تولید ترکیبات فرار و هیدروپراکسیدهای کانژوگه را دارا هستند، می‌باشد. در این آزمون، نانوامولسیون اسانس گریپ‌فروت با محلول بتاکارتن/ لینولئیک اسید مخلوط و پس از گذشت ۱۲۰ دقیقه درصد بازدارندگی طبق فرمول زیر محاسبه گردید (Noshad *et al*., 2020):

درصد بازدارندگی $(\%)= [(AA_{120}–AC_{120})/(AC_0 – AC_{120})] \times 100$

در این رابطه AA_{120} جذب نانوامولسیون اسانس و AC_{120} جذب نمونه کنترل بعد از گذشت ۱۲۰ دقیقه و AC_0 جذب نمونه کنترل در زمان صفر می‌باشد.

اندازه‌گیری فعالیت ضد میکروبی نانوامولسیون اسانس

سویه‌های میکروبی لیوفیلیزه به منظور احیاء و تکثیر در شرایط استریل به محیط کشت مولر هینتون براث اضافه شدند و سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری صورت پذیرفت. در ادامه، سویه‌های میکروبی روی سطح محیط کشت مولر هینتون آگار جهت بدست آوردن کشت تازه بصورت خطی کشت داده شدند. گرمخانه گذاری تحت شرایط فوق تکرار گردید (۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد) و سوسپانسیون‌های باکتریایی از کشت تازه (۲۴ ساعته) و مطابق با استاندارد نیم مک فارلند (Colony Forming Unit/mL $10^8 \times 1/5$) در سرم فیزیولوژی استریل تهیه گردید (Alizadeh Behbahani *et al*., 2019). در نهایت آزمون‌های زیر جهت بررسی فعالیت ضدمیکروبی نانوامولسیون اسانس گریپ‌فروت انجام شدند.

روش دیسک دیفیوژن آگار

ابتدا دیسک‌های بلانک به مدت ۲۰ دقیقه در نانوامولسیون اسانس (استریل شده به کمک فیلتر سرسرنگی ۰/۴۵ میکرون) نگهداری شدند. سپس ۲۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون استاندارد باکتری‌ها روی محیط‌های کشت مولر هینتون آگار کشت سطحی داده شد. در مرحله بعد دیسک های آغشته به نانوامولسیون اسانس روی محیط تثبیت گردید. پس از گرمخانه‌گذاری پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، قطر هاله‌های عدم رشد بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد. از دیسک بدون آنتی‌بیوتیک و اسانس بعنوان کنترل استفاده گردید (Behbahani *et al*., 2018).

روش چاهک آگار

۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی (معادل نیم مک‌فارلند) در سطح محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد. سپس ۲۰ میکرولیتر از نانوامولسیون تهیه شده در درون چاهک‌های ایجاد شده ریخته شد. پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قطر هاله‌های عدم رشد اطراف چاهک‌ها بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری گردید (Mehrnia *et al*., 2021).

روش حداقل غلظت مهارکنندگی

پس از تهیه رقت‌های متوالی از نانوامولسیون اسانس گریپ‌فروت با استفاده از محیط کشت مولر هینتون براث (۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر)، ۲۰۰ میکرولیتر از هر رقت به میکروپلیت-های ۹۶ خانه‌ای حاوی ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی (معادل نیم مک فارلند) اضافه گردید. پلیت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس به چاهک‌ها ۲۰ میکرولیتر معرف تری فنل تترازولیوم ۰/۵ درصد وزنی/حجمی اضافه و مجدداً به مدت ۳۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری انجام شد. در انتها کمترین غلظتی که در آن هیچگونه تغییر رنگی (قرمز تیره یا ارغوانی) مشاهده نشد، به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی گزارش گردید (Behbahani *et al*., 2019).

حداقل غلظت کشندگی

جهت تعیین نتایج این آزمون، از چاهک‌های فاقد رنگ قرمز تیره یا ارغوانی در آزمون حداقل غلظت مهارکنندگی، ۱۰۰ میکرولیتر در پلیت‌های حاوی محیط‌های کشت مولر هینتون آگار به صورت سطحی کشت داده شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، اولین غلظت فاقد رشد به عنوان حداقل غلظت کشندگی گزارش گردید (Noshad *et al*., 2021).

آنالیز آماری

آزمایش‌ها در ۳ تکرار انجام شدند. نتایج بصورت "انحراف معیار ± میانگین" گزارش و نتایج بدست آمده با کمک نرم‌افزار SPSS آنالیز گردید. مقایسه میانگین نتایج توسط آزمون دانکن و در سطح احتمال ۵ درصد ($P<0/05$) بررسی شد.

نتایج و بحث

متابولیت‌های گیاهی با مهار یا نابودی رادیکال‌های آزاد و گونه‌های اکسیژن فعال اثر محافظتی در برابر آسیب اکسیداتیو نشان می‌دهند. بنابراین، آنتی‌اکسیدان‌های حاصل از محصولات طبیعی می‌توانند در درمان یا مهار بیماری‌های حاصل از استرس اکسیداتیو مورد استفاده قرار گیرند و تا حدودی یا به طور کامل جایگزین آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی شوند (Seibert et al., 2019). جدول ۱ نشان می‌دهد که در هر ۳ روش به کار گرفته شده جهت اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی نانوامولسیون گریپ‌فروت، ترکیب از فعالیت آنتی‌اکسیدانی خوبی برخوردار است. به گونه‌ای که میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در روش‌های مهار رادیکال آزاد DPPH و مهار رادیکال آزاد ABTS بر حسب IC_{50} به ترتیب برابر با ۴۲/۲۷ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و ۳۳/۲۷ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و در روش رنگ‌بری بتاکاروتن- لینولئیک اسید برابر با ۵۴/۵۴ درصد می‌باشد. بررسی ویژگی‌های بیولوژیکی و شیمیایی اسانس گریپ‌فروت نشان داد که این اسانس در روش مهار رادیکال DPPH دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالایی می‌باشد (Denkova-Kostova *et al*., 2021). اگرچه تمام ترکیبات موجود در اسانس‌های گیاهی دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشند، بااین‌حال فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها به طور قابل‌توجهی متفاوت است، به گونه‌ای که در بین اسانس‌های مورد مطالعه توسط میشارینا و همکاران (Misharina *et al*., 2008) شامل لیمو، گریپ‌فروت، گشنیز و میخک کمترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در اسانس گریپ‌فروت مشاهده شد. تفاوت در خاصیت آنتی‌اکسیدانی اسانس‌های گیاهی تحت تأثیر شرایط اکولوژی مؤثر در رشد گیاه مانند دما، طول و عرض جغرافیایی، رطوبت، ارتفاع، خاک و اقلیم می‌باشد (Barzegar *et al*., 2019). نانوامولسیون‌ها راهی مناسب جهت رفع مشکل حلالیت پایین اسانس‌های گیاهی می‌باشند و فعالیت آن‌ها به دلیل پخش‌پذیری، پایداری و نفوذ بهتر بهبود می‌یابد (Lou *et al*., 2017). گزارش شده است که با استفاده از روش‌های مختلف ارزیابی خاصیت آنتی‌اکسیدانی از جمله مهار رادیکال‌های DPPH و ABTS نانوامولسیون‌های اسانس *Citrus limonum* دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری در مقایسه با اسانس تولیدی می‌باشد (Kaur *et al*., 2020). مقایسه خاصیت آنتی‌اکسیدانی اسانس خالص گونه‌ای از خانواده مرکبات (*Citrus medica* L. *var. sarcodactylis*) و نانوامولسیون‌های تولیدی از آن با استفاده از روش‌های قدرت احیاء کنندگی آهن و مهار رادیکال DPPH نشان دهنده فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالای نانوامولسیون‌های تولیدی در مقایسه با اسانس بود (Lou *et al*., 2017). در بررسی خصوصیات آنتی‌اکسیدانی نانوامولسیون‌های اسانس شوید مشخص گردید که نانوامولسیون‌های تولیدی دارای پتانسیل خوبی جهت مهار رادیکال‌های DPPH و ABTS بوده و گزارش شد که نانوامولسیون‌های تولیدی توانایی تبدیل به روشی جهت درمان بیماری‌های حاصل از استرس اکسیداتیو را دارا می‌باشند (Tavakkol Afshari *et al*., 2019).

جدول ۱- نتایج فعالیت آنتی‌اکسیدانی نانوامولسیون اسانس گریپ‌فروت

Table 1- The results of antioxidant activity of grapefruit essential oil nanoemulsion

Beta-carotene/linoleic acid (%) بتا-کاروتن/لینولئیک اسید (٪)	ABTS (IC_{50}: mg/ml)	DPPH (IC_{50}: mg/ml)
54.54 ± 0.66	33.27 ± 0.64	42.27 ± 0.59

ترکیبات ضد میکروبی گیاهی از طریق مکانیسم‌های مختلفی قادر به مهار باکتری‌ها بوده و از این رو در نابودی سویه‌های میکروبی مقاوم بسیار ارزشمند می‌باشند (Yazdi *et al.*, 2013). نتایج حاصل از آزمون‌های دیسک دیفیوژن و چاهک آگار در جدول ۲ نشان داده شده است. مشاهده می‌شود که در هر دو روش قطر هاله بازدارندگی ناشی از نانوامولسیون اسانس گریپ‌فروت در باکتری *S. aureus* با *S. epidermidis* و در باکتری *B. cereus* با *B. subtilis* فاقد اختلاف معنی‌داری با یکدیگر می‌باشند، در حالی که در سایر باکتری‌ها اختلاف معنی‌داری مشاهده می‌شود. با توجه به جدول در روش دیسک دیفیوژن آگار کمترین میزان قطر هاله عدم رشد (۷/۳۰ میلی‌متر) مربوط به باکتری *E. coli* بوده که نشان از مقاومت بالای این باکتری گرم منفی در برابر نانوامولسیون تولیدی می‌باشد. همچنین بیشترین میزان قطر هاله عدم رشد (۱۳/۵۰ میلی‌متر) در باکتری *L. innocua* نشان می‌دهد که این باکتری گرم مثبت حساسیت بالایی در برابر نانوامولسیون اسانس گریپ‌فروت دارد. کمترین و بیشترین قطر هاله‌های عدم رشد در روش چاهک آگار نیز به ترتیب در باکتری‌های *E. coli* و *L. innocua* مشاهده می‌شود. با این حال مقادیر بیشتر قطر هاله‌های عدم رشد در روش چاهک آگار در مقایسه با روش دیسک دیفیوژن می‌تواند به دلیل تماس مستقیم نانوامولسیون اسانس با باکتری‌ها در روش چاهک آگار و در نتیجه اثر بخشی بیشتر آن باشد. در حالی که در روش دیسک دیفیوژن ترکیب ضد میکروبی پس از گذشتن از سطح دیسک های بلانک اثر خود را روی باکتری‌ها نشان می‌دهد که در این میان فاکتورهایی مانند قطر، ضخامت، دما و زمان غوطه‌وری دیسک بر نتایج حاصل از روش دیسک دیفیوژن مؤثر می‌باشد (Behbahani *et al.*, 2018).

جدول ۲- نتایج فعالیت ضد میکروبی نانوامولسیون اسانس گریپ‌فروت بر اساس دیسک دیفیوژن آگار و چاهک آگار

Table 2- The results of antimicrobial activity of grapefruit essential oil nanoemulsion based on disc diffusion agar and well diffusion agar methods

Microorganism میکروارگانیسم	Disc diffusion agar (mm) دیسک دیفیوژن آگار (میلی‌متر)	Well diffusion agar (mm) چاهک آگار (میلی‌متر)
E. coli	7.30 ± 0.25 e	8.00 ± 0.19 e
S. typhi	8.10 ± 0.32 de	8.30 ± 0.26 de
P. aeruginosa	9.00 ± 0.41 cd	9.50 ± 0.50 cd
L. innocua	13.50 ± 0.52 a	13.80 ± 0.57 a
S. aureus	11.30 ± 0.27 b	12.10 ± 0.39 b
B. cereus	9.80 ± 0.45 c	10.20 ± 0.47 c
B. subtilis	9.60 ± 0.37 c	10.00 ± 0.37 c
S. pyogenes	10.10 ± 0.46 bc	10.90 ± 0.55 bc
S. epidermidis	11.20 ± 0.33 b	12.00 ± 0.50 b

حروف غیر مشابه نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در $p < 0.05$ می‌باشد.

Different letters indicate a significant difference at $p<0.05$.

حداقل غلظت مهارکنندگی (جدول ۳) برای باکتری‌های *L. innocua* و *S. aureus* (حساس‌ترین باکتری‌ها) برابر با ۲۵ میلی گرم در میلی‌لیتر بود و پس از آن باکتری *S. epidermidis* با غلظتی برابر با ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر قرار داشت. باکتری‌هایی مانند *E. coli*، *S. typhi* و *P. aeruginosa* بیشترین غلظت مهارکنندگی را به خود اختصاص دادند. همچنین کمترین غلظت کشندگی مربوط به باکتری‌های *L. innocua* و *S. aureus* و بیشترین مقدار آن مربوط به *E. coli*، *S. typhi* و *P. aeruginosa* بود. گزارش شده است که اثر ضدمیکروبی کمتر عصاره و اسانس‌های گیاهی روی باکتری‌های گرم منفی در مقایسه با با باکتری‌های گرم مثبت به دلیل وجود غشاهای خارجی اطراف باکتری‌های گرم منفی بوده که منجر به افزایش مقاومت آن‌ها می‌شود. در حقیقت، باکتری‌های گرم منفی دارای ساختار پیچیده لیپوپلی‌ساکاریدی در غشای بیرونی می‌باشند که سبب کاهش سرعت نفوذ ترکیبات آبگریز موجود در اسانس‌ها به داخل سلول می‌شود؛ اما باکتری‌های گرم مثبت دارای لایه موکوپپتیدی ساده و با نفوذپذیری بالایی در ساختار غشای خود می‌باشند که منجر به حساسیت بیشتر

آن‌ها نسبت به ترکیبات آبگریز می‌گردد (Shahidi et al., 2019a; Shahidi et al., 2019b). دنگ و همکاران (Deng et al., 2020) ترکیبات شیمیایی، فعالیت ضد میکروبی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی اسانس گریپ‌فروت را بررسی کردند و مشخص گردید که کمترین قطر هاله عدم رشد مربوط به باکتری گرم منفی *P. aeruginosa* و بیشترین میزان آن مربوط به باکتری گرم مثبت *B. subtilis* می‌باشد (Deng et al., 2020).

جدول ۳- حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) نانوامولسیون اسانس گریپ‌فروت

Table 3- Minumum inhibitory concentration (MIC) and minimum bacricidal concentration (MBC) of grapefruit essential oil nanoemulsion

Microorganism میکروارگانیسم	MIC (mg/ml) حداقل غلظت مهارکنندگی (میلی‌گرم در میلی‌لیتر)	MBC (mg/ml) حداقل غلظت کشندگی (میلی‌گرم در میلی‌لیتر)
E. coli	200	> 400
S. typhi	200	> 400
P. aeruginosa	200	> 400
L. innocua	25	200
S. aureus	25	200
B. cereus	100	400
B. subtilis	100	400
S. pyogenes	100	400
S. epidermidis	50	400

بررسی ترکیبات شیمیایی و خاصیت ضد میکروبی اسانس پوست گریپ‌فروت با استفاده از روش دیسک دیفیوژن آگار نشان داد که اسانس تهیه شده در برابر باکتری‌هایی مانند *S. aureus*، *S. epidermidis* و *E. coli* دارای خاصیت ضد میکروبی با میانگین قطر هاله‌های عدم رشد ۵۳-۱۱ میلی‌متر می‌باشد (Uysal et al., 2011). حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس گریپ‌فروت برای باکتری‌های *Lactobacillus plantarum* و *Streptococcus mutans* بیشتر از ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر گزارش شده است (Filoche et al., 2005).

همانگونه که اشاره شد نانوامولسیون‌ها منجر به کاهش محدودیت های استفاده از اسانس‌ها می‌شوند، از این رو در پژوهش‌های مختلف از این فناوری جهت بررسی فعالیت ضدمیکروبی گونه‌های مختلف خانواده مرکبات استفاده شده است. اوزگول و همکاران (Özogul et al., 2021) گزارش کردند اگرچه اسانس پوست گریپ‌فروت دارای اثر ضد میکروبی بر روی بیشتر باکتری‌های مورد مطالعه می‌باشد، اما گنجاندن اسانس در سیستم نانوامولسیون سبب افزایش خاصیت باکتریواستاتیک می‌شود (Özogul et al., 2021). بررسی اثر ضد میکروبی نانوامولسیون‌های اسانس‌های تولیدی ۴ گونه از خانواده مرکبات شامل گریپ‌فروت، پرتقال، نارنگی و لیمو بر روی فیله نوعی ماهی قزل‌آلا نشان داد که نانوامولسیون‌های تولیدی سبب افزایش ماندگاری شده و در پایان دوره نگهداری کمترین میزان رشد باکتری در نمونه‌های حاوی نانوامولسیون گریپ‌فروت مشاهده شد (Durmus, 2020). در مقایسه نانوامولسیون‌های اسانس *Citrus medica* L. *var. sarcodactylis* با استفاده از سورفاکتانت‌ها و کوسورفاکتانت‌های مختلف مشخص گردید که تمام نمونه‌های تولیدی دارای خاصیت ضد باکتریایی بالایی در برابر باکتری‌های *E. coli*، *B. subtilis* و *S. aureus* می‌باشند که نشان دهنده کاربرد بالقوه آنها در زمینه‌های غذایی و آشامیدنی می‌باشد (Li et al., 2018). فعالیت ضد میکروبی نانوامولسیون اسانس لیمو و ۲ غلظت ۱۰ و ۱۰۰ درصد اسانس آن بر روی تعدادی از پاتوژن‌های غذایی و تعدادی از باکتری‌های آلوده‌کننده ماهی با استفاده از روش‌های دیسک دیفیوژن آگار، حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی نشان داد که نانوامولسیون‌های تولیدی سبب بهبود خاصیت ضد میکروبی می‌شود، بنابراین این نانوامولسیون‌ها می‌توانند به عنوان ترکیب ضد میکروبی طبیعی در جهت کنترل و مهار این گروه از باکتری‌ها مورد استفاده قرار گیرند (Yazgan et al., 2019).

ترکیبات متعددی در اسانس‌های گیاهی حضور دارند و مکانیسم ضد میکروبی واحدی را نمی‌توان برای اسانس‌ها در نظر گرفت. آبگریزی یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های اسانس‌های گیاهی و ترکیبات آنها است که منجر به نفوذ این ترکیبات به بخش لیپیدی غشای سلولی باکتریایی و میتوکندری و در نهایت اختلال در ساختار آنها می‌گردد. این پدیده سبب نشت یون‌ها و دیگر ترکیبات سلول می‌شود که تداوم آن به خروج مولکول‌های حیاتی سلول و در نهایت تخریب آن منجر می‌گردد. علاوه بر این، ساختار لیپید و بار الکتریکی غشای سلولی نیز بدلیل قابلیت عبور ترکیبات ضد میکروب آبگریز از سلول، تحت تأثیر قرار می‌گیرند که کاهش رشد و در نتیجه مرگ سلول را بدنبال دارد (Behbahani et al., 2017).

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که نانوامولسیون اسانس گریپ‌فروت دارای فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد قابل‌توجهی می‌باشد. اثر ضدمیکروبی شکل نانوامولسیون این ترکیب زیست فعال در برابر باکتری‌های بیماری‌زا و مولد فساد نیز قابل‌توجه بود و نانوامولسیون اسانس گریپ‌فروت سبب مهار رشد و از بین بردن باکتری‌های *E. coli*، *S. typhi*، *P. aeruginosa*، *L. innocua*، *S. aureus*، *B. cereus*، *B. subtilis*، *S. pyogenes* و *S. epidermidis* گردید و این اثر وابسته به غلظت اسانس ریزپوشانی شده و نوع باکتری بود. بنابراین، نانوامولسیون بر پایه اسانس گریپ‌فروت قابلیت کاربرد بعنوان عامل آنتی‌اکسیدان و ضدمیکروب طبیعی در برابر باکتری‌های پاتوژن و مولد فساد در صنایع غذایی را دارا می‌باشد. در این راستا، بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی و همچنین فعالیت ضدمیکروبی نانوامولسیون اسانس گریپ‌فروت در برابر باکتری‌های مولد فساد و پاتوژن در مواد غذایی مختلف در مطالعات آتی پیشنهاد می‌گردد.

سپاسگزاری

مقاله علمی–پژوهشی حاضر مستخرج از رساله دکتری مصوب در گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد با کد ۳/۵۲۶۸۷ می‌باشد. لذا نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه فردوسی مشهد به جهت مساعدت‌های مادی و معنوی در اجرای این پژوهش تشکر و قدردانی کنند.

منابع

1. Ahmadi, O., & Jafarizadeh Malmiri, H. (2020). Effectiveness of soluble oxygen in preparation of thyme oil nanoemulsion-simulation and characterization. *Iranian Chemical Engineering Journal, 19*(110), 42-53. (In Persian with English abstracrt)
2. Alizadeh Behbahani, B., Falah, F., Vasiee, A., Tabatabaei Yazdi, F., & Mortazavi, S.A. (2019). Antimicrobial effect of *Citrus aurantium* essential oil on some foodborne pathogens and determination of its chemical compounds, total phenol content, total flavonoids content and antioxidant potential. *Food Science and Technology*, *87*(16), 291-304.
3. Alves, J.A., Mantovani, A.L.L., Martins, M.H.G., Abrao, F., Lucarini, R., Crotti, A.E.M., & Martins, C.H.G. (2015). Antimycobacterial activity of some commercially available plant-derived essential oils. *Chemistry of Natural Compounds*, *51*(2), 353-355. https://doi.org/10.1007/s10600-015-1281-0
4. Barzegar, H., Mehrnia, M.A., & Alizadeh Behbahani, B. (2019). Determination of the chemical composition, antioxidant activity and the antimicrobial effect of *Heracleum lasiopetalum* on infection and food poisoning microorganisms. *Journal of Applied Microbiology in Food Industry*, *4*(4), 15-28.
5. Behbahani, B.A., & Fooladi, A.A.I. (2018). Evaluation of phytochemical analysis and antimicrobial activities *Allium* essential oil against the growth of some microbial pathogens. *Microbial Pathogenesis*, *114*, 299-303. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.11.055
6. Behbahani, B.A., Noshad, M., & Falah, F. (2019). Study of chemical, structure, antimicrobial, cytotoxic and mechanism of action of *Syzygium aromaticum* essential oil on foodborn pathogens. *Potravinarstvo*, *13*(1).
7. Behbahani, B.A., Shahidi, F., Yazdi, F.T., Mortazavi, S.A., & Mohebbi, M. (2017). Use of *Plantago major* seed mucilage as a novel edible coating incorporated with *Anethum graveolens* essential oil on shelf life extension of beef in refrigerated storage. *International Journal of Biological Macromolecules*, *94*, 515-526. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.055
8. Behbahani, B.A., Yazdi, F.T., Vasiee, A., & Mortazavi, S.A. (2018). *Oliveria decumbens* essential oil: Chemical compositions and antimicrobial activity against the growth of some clinical and standard strains causing infection. *Microbial Pathogenesis*, *114*, 449-452. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.12.033
9. Deng, W., Liu, K., Cao, S., Sun, J., Zhong, B., & Chun, J. (2020). Chemical composition, antimicrobial, antioxidant, and antiproliferative properties of grapefruit essential oil prepared by molecular distillation. *Molecules*, *25*(1), 217. https://doi.org/10.3390/molecules25010217
10. Denkova-Kostova, R., Teneva, D., Tomova, T., Goranov, B., Denkova, Z., Shopska, V., ... & Hristova-Ivanova, Y. (2021). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of essential oils from tangerine (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.), lemon (*Citrus lemon* L.) and cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* Blume). *Zeitschrift für Naturforschung C*, *76*(5-6), 175-185.
11. Durmus, M. (2020). The effects of nanoemulsions based on citrus essential oils (orange, mandarin, grapefruit, and lemon) on the shelf life of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets at 4±2° C. *Journal of Food Safety*, *40*(1), e12718. https://doi.org/10.1111/jfs.12718
12. Erfani, A., Pirouzifard, M., Almasi, H., & Gheybi, N. (2019). Microencapsulation of cinnamon essential oil Nano emulsion stabilized with β-cyclodextrin and sodium caseinate. *FSCT*, *16*(91), 107-117.

13. Filoche, S.K., Soma, K., & Sissons, C.H. (2005). Antimicrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidine digluconate. *Oral Microbiology and Immunology*, *20*(4), 221-225. https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2005.00216.x
14. Gharenaghadeh, S., Samadlouie, H.R., Sowti, M., & Gharenaghadeh, S. (2017). Nano emulsion formulation from essential oil of *Salvia hypoleuca* and investigation of its antimicrobial and physicochemical properties. *Food Science and Technology*, *14*(9), 337-348.
15. Heydari, M., & Bagheri, M. (2018). Synthesis, characterization and investigation of properties of nanoemulsion Persian cumin essential oil. *Journal of Advanced Materials and Technologies*, *7*(2), 49-56.
16. Javanshir, A., Karimi, E., & Homayouni Tabrizi, M. (2020). Investigation of antioxidant and antibacterial potential of *Ricinus communis* L. nano-emulsions. *Jundishapur Scientific Medical Journal*, *19*(1), 1-9. (In Persian with English abstracrt)
17. Kaur, H., Pancham, P., Kaur, R., Agarwal, S., & Singh, M. (2020). Synthesis and characterization of *Citrus limonum* essential oil based nanoemulsion and its enhanced antioxidant activity with stability for transdermal application. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, *11*(4), 215-236. https://doi.org/10.4236/jbnb.2020.114014
18. Li, Z. H., Cai, M., Liu, Y. S., & Sun, P.L. (2018). Development of finger citron (*Citrus medica* L. var. sarcodactylis) essential oil loaded nanoemulsion and its antimicrobial activity. *Food Control*, *94*, 317-323. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.07.009
19. Lou, Z., Chen, J., Yu, F., Wang, H., Kou, X., Ma, C., & Zhu, S. (2017). The antioxidant, antibacterial, antibiofilm activity of essential oil from *Citrus medica* L. var. sarcodactylis and its nanoemulsion. *LWT*, *80*, 371-377. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.02.037
20. Majdi, B., Mehrnia, M. A., Barzegar, H., & Alizadeh Behbahani, B. (2021). Determination of the structure, chemical composition, antioxidant activity and the cytotoxic effect of Turmeric essential oil. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, *17*(2), 261-271. (In Persian with English abstracrt). https://doi.org/10.22067/ifstrj.2020.39272
21. Masoumi, V.O., Tajik, H., Moradi, M., Forough, M., & Shahabi, N. (2016). Antimicrobial effects of *Zataria multiflora* Boiss. Essential oil nanoemulsion against *Escherchia coli* O157:H7. *Studies in Medical Sciences*, *27*(7), 608-617.
22. Mehrnia, M.A., Alizadeh Behbahani, B., Barzegar, H., & Tanavar, H. (2021). Sclerorhachis platyrachis essential oil: Antioxidant power, total phenolic and flavonoid content and its antimicrobial activity on some Gram-positive and Gram-negative bacteria "*in vitro*". *FSCT*, *18*(112), 189-198. https://doi.org/10. 52547/fsct.18.03.16
23. Mesgarpour, B., Adhami, H., & Amanlou, M. (2002). Grapefruit juice effects. *Journal of Medicinal of Plants*, *1*(1), 47-62.
24. Misharina, T.A., & Samusenko, A.L. (2008). Antioxidant properties of essential oils from lemon, grapefruit, coriander, clove, and their mixtures. *Applied Biochemistry and Microbiology*, *44*(4), 438-442. https://doi.org/10.1134/S0003683808040182
25. Moghimi, R., Ghaderi, L., Rafati, H., Aliahmadi, A., & McClements, D.J. (2016). Superior antibacterial activity of nanoemulsion of *Thymus daenensis* essential oil against *E. coli*. *Food Chemistry*, *194*, 410-415. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.139
26. Noshad, M., Alizadeh behbahani, B., & Dehghani, S. (2020). Evaluation of the effect of aqueous and ethanolic extraction methods on extraction yield, phenolic compounds, and antioxidant and antimicrobial activity of *Stachys schtschegleevii* extract. *Food Science and Technology*, *17*(100), 117-125. https://doi.org/10.52547/fsct.17.100.117
27. Noshad, M., Alizadeh Behbahani, B., & Dehghani S. (2020). Improving oxidative and microbial stability of beef by using a bioactive edible coating obtained from Barhang-e-Sagheerseed mucilage and loaded with Avishan-e-Baghi. *Food Science and Technology*, *17*(4), 1-3. https://doi.org/10.52547/fsct.17.101.1
28. Noshad, M., Alizadeh behbahani, B., Jooyandeh, H., Rahmati-Joneidabad, M., Ebrahimi, M., & Ghodsi Sheikhjan, M. (2021). In vitro investigation of the antimicrobial activity of Dezfuli orange peel essential oil with and without common antibiotics on some pathogenic bacteria. *Food Science and Technology*, *18*(111), 159-167. https://doi.org/10.52547/fsct.18.111.159
29. Özogul, Y., Özogul, F., & Kulawik, P. (2021). The antimicrobial effect of grapefruit peel essential oil and its nanoemulsion on fish spoilage bacteria and food-borne pathogens. *LWT*, *136*, 110362. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110362
30. Poorhasan, F., Zokaee, A., & Rahmani, M. (2012). Review on nanoemulsions production and comparison of homogenizers efficiencies. *Iranian Chemical Engineering Journal*, *11*(63), 4-12. (In Persian with English abstracrt)
31. Seibert, J.B., Rodrigues, I.V., Carneiro, S.P., Amparo, T.R., Lanza, J.S., Frézard, F.J.G., ... & Santos, O.D.H.D. (2019). Seasonality study of essential oil from leaves of *Cymbopogon densiflorus* and nanoemulsion development with antioxidant activity. *Flavour and Fragrance Journal*, *34*(1), 5-14. https://doi.org/10.1002/ffj.3472

32. Shahidi, F., Yazdi F, T., Roshanak, S., Behbahani, B.A., Norouzi, N., & Vasiee, A. (2019a). Antimicrobial activity of *Lepidium draba* extract on some pathogenic microorganisms “in vitro”. *Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine, 24*(85), 1-9. (In Persian with English abstracrt)
33. Shahidi, F., Yazdi, F.T., Behbahani, B.A., Roshanak, S., Norouzi, N., & Vasiee, A. (2019b). Aantibacterial effect of *Tragopogon graminifolius* extract on *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* and *Salmonella typhi* “in vitro”. *Iranian Journal of Infectious Diseases, 24*(84), 1(10). (In Persian with English abstracrt)
34. Tanavar, H., Barzegar, H., Alizadeh Behbahani, B., & Mehrnia, M.A. (2020). *Mentha pulegium* essential oil: chemical composition, total phenolic and its cytotoxicity on cell line HT29. *Iranian Food Science and Technology Research Journal, 16*(5), 643-653. (In Persian with English abstracrt). https://doi.org/10.22067/ifstrj.v16i5.84722
35. Tavakkol Afshari, H.S., Homayouni Tabrizi, M., & Ardalan, T. (2019). Evaluation of antioxidant and anticancer effects of nanoemulsions prepared using dill essential oil. *Journal Arak University Medical Science, 22*(4): 40-51. (In Persian with English abstracrt)
36. Uysal, B., Sozmen, F., Aktas, O., Oksal, B.S., & Kose, E.O. (2011). Essential oil composition and antibacterial activity of the grapefruit (*Citrus paradisi* L.) peel essential oils obtained by solvent-free microwave extraction: comparison with hydrodistillation. *International Journal of Food Science & Technology, 46*(7), 1455-1461. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02640.x
37. Yang, S.A., Jeon, S.K., Lee, E.J., Shim, C.H., & Lee, I.S. (2010). Comparative study of the chemical composition and antioxidant activity of six essential oils and their components. *Natural Product Research, 24*(2), 140-151. https://doi.org/10.1080/14786410802496598
38. Yazdi, F.T., & Behbahani, B.A. (2013). Antimicrobial effect of the aqueous and ethanolic *Teucrium polium* L. extracts on gram positive and gram negative bacteria “in vitro”. *Archives of Advances in Biosciences, 4*(4), 56-62.
39. Yazgan, H., Ozogul, Y., & Kuley, E. (2019). Antimicrobial influence of nanoemulsified lemon essential oil and pure lemon essential oil on food-borne pathogens and fish spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology, 306*, 108266. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108266